



(19) RU⁽¹¹⁾ 1 347 224⁽¹³⁾ C
(51) МПК⁶ A 61 K 39/40

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 4066843/13, 08.05.1986

(46) Дата публикации: 20.11.1995

(56) Ссылки: Гогиашвили Д.А. Антитоксические свойства противосибиреязвенных сывороток. Автореферат диссертации. М., 1975. Ветеринарные биопрепараты. /Под ред. Д.Ф.Осидзе, М., 1981, с. 163 - 176. Авторское свидетельство СССР N 731631, кл. А 61K 39/40, 1974.

(71) Заявитель:
Всесоюзный государственный
научно-контрольный институт ветпрепаратов

(72) Изобретатель: Романов Г.И.,
Маничев А.А., Саленко Л.С., Степанова
В.В., Захаров Д.Г., Комелина Л.И., Бондаренко
Н.А., Тимошенко С.М., Поляков В.А., Митин
С.С.

(73) Патентообладатель:
Всесоюзный государственный
научно-контрольный институт ветпрепаратов

(54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

(57)

Изобретение относится к ветеринарной микробиологии, в частности к производству ветеринарных биологических препаратов. Цель изобретения повышение специфической активности сыворотки, упрощение и ускорение способа ее получения, более эффективное использование продуцентов. В качестве антигена для гипериммунизации лошадей-продуцентов используют вегетативную культуру вакцинного бескапсульного сибиреязвенного штамма СТИ 1. Гипериммунизацию проводят в два этапа: производят 5 инъекций антигена параллельно подкожно в возрастающих дозах от 0,4 - 0,6 до 4,0 6,0 млрд. микробных клеток и внутрикожно в постоянных дозах 0,4 0,6 млрд. клеток, на втором этапе производят

8 инъекций антигена подкожно в возрастающих дозах от 8,0 12,0 до 78,0 126,0 млрд. клеток. Интервал между инъекциями 3 4 дня. Через 7 9 дней после окончания гипериммунизации производят крововязание от каждого продуцента. Отделяют сыворотку общепринятым методом. Сыворотку используют для профилактики и лечения сибирской язвы. Препарат животным вводят подкожно или внутримышечно. Полученная сыворотка обладает высокой протективной и терапевтической активностью, широким спектром защитного действия в отношении разных вирулентных сибиреязвенных штаммов. Специфическая активность препарата сохраняется в течение 3,5 лет после изготовления. 3 табл.

RU 1 347 224 C

RU 1 347 224 C



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **1 347 224** ⁽¹³⁾ **C**
(51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 39/40**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4066843/13, 08.05.1986

(46) Date of publication: 20.11.1995

(71) Applicant:
Vsesojuznyj gosudarstvennyj
nauchno-kontrol'nyj institut vetpreparatov

(72) Inventor: Romanov G.I.,
Manichev A.A., Salenko L.S., Stepanova
V.V., Zakharov D.G., Komelina L.I., Bondarenko
N.A., Timoshenko S.M., Poljakov V.A., Mitin S.S.

(73) Proprietor:
Vsesojuznyj gosudarstvennyj
nauchno-kontrol'nyj institut vetpreparatov

(54) **METHOD FOR PRODUCING SERUM AGAINST ANTHRAX**

(57) **Abstract:**

FIELD: veterinary medicine. SUBSTANCE:
method involves using vegetative culture of
vaccinal capsules anthrax strain STI-1 as
antigen for hyperimmunizing producer horses.
Hyperimmunization is carried out in two
stages. First, five injections of the
antigen are subcutaneously administered
concurrently at increasing doses from
0.4-0.6 to 4.0-6.0 milliards of microbial
cells and intracutaneously administered at
constant doses from 8.0-12.0 to 78.0-126.0
milliards of cells. The second stage

involves subcutaneously administering eight
injections of the antigen at increasing
doses from 8.0-12.0 to 78.0-126.0 milliards
of cells. Pause between the injections is
3-4 days long. Blood is taken from each
serum producer 7-9 days later, after the
hyperimmunization is over. The serum is used
for treating and preventing anthrax. The
preparation is administered subcutaneously
or intra muscularly. EFFECT: high
therapeutic and protective activity; wider
range of applications. 3 tbl

RU 1 347 224 C

RU 1 347 224 C

Изобретение относится к ветеринарной микробиологии, в частности к производству ветеринарных биологических препаратов, и может найти применение в ветеринарной практике для лечения и профилактики сибирской язвы животных.

Целью изобретения является повышение специфической активности сыворотки, упрощение и ускорение способа ее получения, более эффективное использование продуцентов.

Пример 1. Приготовление антигена для гипериммунизации.

Споровую культуру штамма СТИ-1 высевают во флаконы с МПБ (рН $7,0 \pm 0,2$) в количестве $0,2-0,3 \text{ см}^3$ и посевы инкубируют в течение 18-20 ч при $37-38^\circ\text{C}$. По истечении этого срока полученную бульонную культуру проверяют макроскопически и микроскопически на чистоту и типичность роста.

После проверки матричной культуры проводят посевы ее в количестве $5-10 \text{ см}^3$ в стеклянные бутылки-четверти, заполненные на $2/3$ объема МПБ. Посевы инкубируют в течение 18-22 ч при $37-38^\circ\text{C}$. Вырастившую микробную культуру по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича доводят до концентрации 500-100 млн. микробных клеток/ см^3 , проверяют макроскопически и микроскопически на бактериальную чистоту, типичность, после чего используют для гипериммунизации продуцентов для первых шести инъекций.

Для последующих инъекций используют концентрированную бактериальную суспензию штамма СТИ-1. С этой целью полученную бактериальную суспензию штамма СТИ-1 с концентрацией клеток 500-100 млн./ см^3 преципитируют калийными квасцами. Квасцы добавляют в количестве 0,1 мас. в виде 4%-ного раствора. Смесь отстаивают в течение 20-30 мин и при помощи сифона отсасывают часть отстоявшейся жидкости (30-40%). Концентрированный остаток микробных клеток (см^3) используют для дальнейшей гипериммунизации продуцентов.

Гипериммунизация лошадей. Лошадей 3-6 лет массой не менее 350 кг гипериммунизируют по схеме, представленной в табл.1. При этом суточную бульонную культуру штамма СТИ-1 продуцентам вводят в объемах 1, 2, 4, 5, 10, 20 см^3 подкожно (инъекции N 1-6) и 1 см^3 внутрикожно (инъекции N 1-5), а концентрированный антиген в объемах 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150 см^3 (инъекции N 7-13) подкожно.

В процессе обработки схемы гипериммунизации лошадей установлено, что введение антигена в дозах, превышающих максимальные, вызывает резко выраженную нежелательную ответную реакцию организма продуцентов (сильное угнетение, повышение температуры тела, иногда гибель продуцентов). Введение лошадям антигена в дозах меньших, чем минимальные, приводит к получению противосибирезавенной сыворотки специфической активности, уступающей сыворотке, полученной при использовании вирулентных сибирезавенных штаммов.

Взятие крови. Через 7-9 дней после

окончания гипериммунизации производят первое "рабочее" крововзятие от каждого продуцента. Второе и последующие крововзятия производят через 7-9 дней после введения "рабочей" дозы антигена ($41,6-67,2$ млрд. микробных клеток), которые вводят через 3-4 дня после очередного крововзятия.

Порядок взятия и обработки крови. Кровь от продуцентов берут в градуированные стерильные бутылки емкостью 15-20 л. Первое крововзятие производят из расчета $8-10 \text{ см}^3$, а последующие из расчета $16-20 \text{ см}^3$ на 1 кг массы лошади.

Для отделения сыворотки применяют общепринятый метод цитрирования крови с последующим сепарированием и дефибриацией плазмы.

Контроль сыворотки на специфическую активность. Контроль сыворотки на активность проводят на трех кроликах, которых после внутривенного введения сыворотки в дозе 2 см^3 на 1 кг живого веса заражают культурой вирулентного сибирезавенного штамма Ч-7 в дозе 10 ЛД₅₀. При выживании минимум двух кроликов из трех привитых сыворотку считают активной.

Сыворотка не теряет своей активности в течение 3,5 лет хранения.

Пример 2. Сыворотку используют для профилактики и лечения сибирской язвы. Препарат животным вводят подкожно или внутримышечно в дозах, указанных в табл.2.

Превентивную активность сывороток определяют в опытах на кроликах и овцах количественным методом в сравнении с активностью сыворотки, полученной с использованием в качестве антигена культур 12 вирулентных сибирезавенных штаммов, т. е. полученной по используемой в настоящее время технологии. Сыворотки (каждую в отдельности) кроликам вводят внутривенно в неразведенном виде и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8 в дозах из расчета по 2 см^3 на 1 кг массы кролика, овцам подкожно в дозах 20, 10, 5 и $2,5 \text{ см}^3$ на 1 голову. Одновременно привитых сывороткой и контрольных (непривитых) животных заражают культурой вирулентного сибирезавенного штамма Ч-7 подкожно в дозе 20 ЛД₅₀. На каждую дозу сыворотки и в контроль берут не менее четырех животных. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 10 сут, после чего окончательно учитывают результаты. ЕД₅₀ сывороток рассчитывают по методу Кербера в модификации Ашмарина (Ашмарин И.П. Воробьев А.В. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л. 1962).

В результате испытаний установлено, что в опытах на кроликах сыворотка, изготовленная по предлагаемому способу, активнее сыворотки, полученной с использованием культур вирулентных штаммов (ЕД₅₀ соответственно 1,0 и $1,2 \text{ см}^3$), а в опытах на овцах значительно превосходит по активности последнюю (ЕД₅₀ соответственно 2,97 и $7,07 \text{ см}^3$).

Терапевтическую активность сывороток определяют количественным методом в опытах на кроликах. С этой целью сыворотки кроликам вводят внутривенно в неразведенном виде и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8. Через 24 ч привитых сыворотками и контрольных (непривитых) животных

заражают культурой штамма 4-7, как при проверке превентивных свойств. На каждую дозу сыворотки и в контроль берут не менее четырех кроликов. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 10 сут, после чего по методу Кербера в модификации Ашмарина рассчитывают ЕД₅₀ сывороток.

Результаты испытаний показали, что сыворотка, изготовленная по предлагаемому способу, по терапевтической активности превосходит сыворотку, полученную с использованием вирулентных сибиреязвенных штаммов (ЕД₅₀ соответственно 1,4 и 2,0).

П р и м е р 3. Количественным методом (описание метода дано в примере 2) проверены превентивные свойства сывороток, полученных после двенадцатой инъекции антигена (доза 62,4-100,8 млрд. микробных тел), тринадцатой инъекции антигена (доза 78,0-126,0 млрд. микробных тел) и дополнительной четырнадцатой инъекции антигена (доза 93,6-151,2 млрд. микробных тел). Всего проведено 3 опыта, в которых использовано 216 кроликов. Установлено, что сыворотка, полученная от продуцентов после двенадцатой инъекции антигена, менее активна, чем сыворотка, полученная после тринадцатой инъекции (ЕД₅₀ соответственно 2,0 и 1,0 см³). Последующая инъекция антигена не приводит к повышению активности полученных от продуцентов сывороток (ЕД₅₀ остается на прежнем уровне, 1,0 см³). Следовательно, оптимальная схема гипериммунизации лошадей-продуцентов предусматривает 13 инъекций антигена.

П р и м е р 4. Оценка биологических свойств сыворотки (по определению спектра защитного действия в отношении разных штаммов возбудителя болезни).

Спектр защитного действия сывороток, полученных предлагаемым способом и с использованием вирулентных сибиреязвенных штаммов, против 12 вирулентных штаммов возбудителя антракса изучают в опытах на кроликах. С этой целью кроликам внутривенно вводят испытуемые сыворотки (каждую в отдельности) в дозе 2 см³ на 1 кг массы. Одновременно привитых и контрольных (непривитых) животных

заражают культурами вирулентных сибиреязвенных штаммов подкожно в дозе ЛД₅₀. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 10 сут, после чего учитывают опыт. Результаты опытов представлены в табл.3.

Таким образом, проведенные испытания показали, что предлагаемый способ изготовления сыворотки против сибирской язвы обеспечивает получение более эффективного препарата, чем известные способы, с высокой протективной и терапевтической активностью, широким спектром защитного действия в отношении разных вирулентных сибиреязвенных штаммов, сохраняющего свою специфическую активность в течение 3,5 лет после изготовления.

Применение в качестве антигена культуры одного штамма СТИ-1 по указанной схеме позволяет повысить специфическую активность противосибиреязвенной сыворотки, значительно упростить и удешевить технологию ее производства, исключить возможность заражения сибирской язвой людей и обсеменения окружающей среды спорами вирулентных штаммов антракса, в более короткие сроки (43-57 дней вместо 59-109 дней) получить сыворотку, значительно более эффективно использовать продуценты (очередные кровозаятия через 10-12 дней вместо 31-80).

Формула изобретения:

СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ путем гипериммунизации продуцентов антигеном из штамма СТИ-1 с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения специфической активности сыворотки, ускорения и упрощения способа, гипериммунизацию проводят в два этапа, при этом на первом этапе антиген вводят пятикратно, параллельно подкожно и внутрикочно, а на втором восьмикратно подкожно в возрастающих дозах от 8,0 12,0 до 78,0 126,0 млрд. микробных клеток с общим интервалом между введениями 3 4 дня, причем на первом этапе подкожное введение осуществляют в возрастающих дозах от 0,4 0,6 до 4,0 6,0 млрд. микробных клеток, а внутрикочное в дозе 0,4 0,6 млрд. микробных клеток.

50

55

60

Таблица 1

Номер инъекции	Антиген для гипериммунизации	Путь введения антигена	Доза антигена, млрд. клеток	
			минимальная	максимальная
1	Суточная бульонная культура штамма СТИ-1	Подкожно	0,4	0,6
2	То же	Внутрикожно	0,4	0,6
		Подкожно	0,8	1,2
		Внутрикожно	0,4	0,6
3	—"	Подкожно	1,6	2,4
		Внутрикожно	0,4	0,6
4	—"	Подкожно	2,0	3,0
		Внутрикожно	0,4	0,6
5	—"	Подкожно	4,0	6,0
		Внутрикожно	0,4	0,6
6	—"	Подкожно	8,0	12,0
7	Концентрированная бульонная культура штамма СТИ-1	То же	20,8	33,6
8	То же	—"	26,0	42,0
9	—"	—"	31,2	50,4
10	—"	—"	41,6	67,2
11	—"	—"	52,0	84,0
12	—"	—"	62,4	100,8
13	—"	—"	78,0	126,0

Примечание. Интервал между инъекциями 3-4 дня;
"рабочая" доза антигена 41,6-67,2.

Таблица 2

Вид животного	Доза сыворотки, см ³	
	предохранительная	лечебная
Лошади и верблюды	15-20	100-200
Взрослый крупный рогатый скот	15-20	100-200
Овцы, козы, свиньи, телята	8-10	50-100

Таблица 3

Вирулентные сибиреязвенные штаммы, используемые для заражения кроликов	Процесс выживших кроликов при использовании сыворотки, изготовленной по способу	
	известному	предлагаемому
Коломна	90	90
231	100	100
1051/35	70	80
2555/18	70	80
47	90	100
228	90	100
17	90	100
37	50	60
992	80	90
ЗБК-2	60	60
362	80	90
230	60	100

Примечание. Сыворотка считается активной, если предохраняет от гибели не менее 60% зараженных животных.

RU 1347224 C

RU 1347224 C